

⑥ Int. Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和60年(1985)6月1日

G 01 N 27/26

B 01 D 13/02

C 12 P 19/34

C-7363-2G

7917-4D

8314-4D

7110-4B

審査請求 未請求 発明の数 1 (全6頁)

⑭ 発明の名称 電氣的に荷電された巨大分子を電気溶離するための方法と装置

⑮ 特 願 昭59-151117

⑯ 出 願 昭59(1984)7月20日

優先権主張 ⑰ 1983年10月17日 ⑱ 西ドイツ(DE) ⑲ P 3337668.9

⑳ 発 明 者 ニ ル ス ヘ セ ドイツ連邦共和国、デー3352 アインベック、ネーゲンボルナー ベーク 68

㉑ 出 願 人 カール シュライヒャー ウント シュール ドイツ連邦共和国、デー3352 アインベック、グリムゼー  
ルシュトラッセ 23

ゲーエムベーハー

ウント コンパニ カ  
ーゲー

㉒ 代 理 人 弁理士 山本 亮一

最終頁に続く

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

電氣的に荷電された巨大分子を電気溶離するための方法と装置

## 2. 特許請求の範囲

1. 溶離すべき巨大分子を外的な電場の作用下に溶離空間からトラップ中に移動させることにより電氣的に荷電された巨大分子を電気溶離するための方法において、電場中で移動する巨大分子は、電場中では巨大分子を透過するが、電場のない状態では如何なる物質の移動に対しても実質的に非透過性であり、特に耐水性であるような内側のトラップ膜(M2)をまず透過され、次いで電場中では小さなイオンと分子を透過するが、電場中であつてさえも巨大分子は透過させないような外側のトラップ膜(M1;M3)に送られ、その後に巨大分子は、2つのトラップ膜(M1,M2;M2,M3)の間にあるトラップから液体媒体と一緒に取り出されることを特徴とする方法。

2. 全ての巨大分子が溶離空間から溶離空間のいづ

れかの側において電場方向に配置された1つのトラップ又は2つのトラップ(M1,M2;M2,M3)の中へ移動された後に、巨大分子を透過しない膜(M1;M3)上に集まった巨大分子を膜から再び解き離し、かつその巨大分子をトラップ中に導入された媒体中に移動させるために、電場の極性が短時間の間逆転されることを特徴とする、特許請求の範囲第1項に記載の方法。

3. 溶離空間(1)がトラップ(2)の内側の膜(M2)と外側の膜(M1又はM3)により隣接されていることを特徴とする、特許請求の範囲第1項又は第2項に記載の方法を実施するための装置。

4. 溶離空間(1)が2つのトラップ(M1,M2;M2,M1又はM3,M2;M2,M3 又はM1,M2;M2,M3)により隣接されていることを特徴とする、特許請求の範囲第3項に記載の装置。

5. トラップ(2;3)の体積が溶離空間(1)の体積の1/10~1/100であることを特徴とする、特許請求の範囲第3項又は第4項に記載の装置。

6. 膜(M1,M2,M3)が使用される溶離媒体又は使

用される緩衝溶液により湿潤されうることを特徴とする。特許請求の範囲第3～5項のいずれかに記載の装置。

7. 電場の存在下であってさえも、内側のトラップ膜(M2)がバクテリアを透過しないことを特徴とする。特許請求の範囲第3～5項のいずれかに記載の装置。

8. 少なくとも1つの膜(M1,M2,M3)が非対称な膜であり、その膜の密な又は活性な表面がトラップ(2;3)の内部に面していることを特徴とする。特許請求の範囲第3～7項のいずれかに記載の装置。

9. 外的な電場の負電極に配置された外側の膜(M1)は任意な正電荷の巨大分子を吸着したり又は吸着しなかつたりし、また外的な電場の正電極に配置された外側の膜(M3)は任意な負電荷の巨大分子を吸着したり又は吸着しなかつたりすることを特徴とする。特許請求の範囲第3～8項のいずれかに記載の装置。

### 3. 発明の詳細な説明

イオケミストリィ124, P299～302(1982)に記載されている。この方法の場合には、溶離される巨大分子のために用いられるトラップ(trap)は吸着ゲル特にマラカイト緑ゲルを含有する小さなナイロン袋であり、その中で電気泳動ゲルから溶離される巨大分子は一時的に吸着される。電気溶離が完了した後は、今度は一時的な吸着ゲルがカラム中で特に1モルの過塩素酸ナトリウム溶液により溶離される。この一時的な吸着により生じる巨大分子の損失は少なくとも約25%であり、そのため、言い換えれば、この方法により得られる最大の収率は75%に過ぎない。そしてこの収率が現在利用されている方法の最善値である。その上、この方法は以上に時間を浪費しかつ高価である。とりわけ特に一時的な吸着ゲルの材料費が高価であるため、高価であり、また巨大分子の第2の溶離のため時間を浪費する。すなわちこの公知の方法により電気泳動ゲル留分を仕上げるのに、少なくとも40分間の時間を必要とする。

(発明が解決しようとする課題)

(産業上の利用分野)

本発明は、電気的に荷電された巨大分子を電気溶離するための方法、及びその方法を実施するための装置に関する。

本発明の範囲内では、電気溶離(electroelution)という後は、ゲル特に電気泳動ゲルから巨大分子を溶離させること(即ち、いわゆる古典的な電気溶離)だけでなく、脱塩や異なる緩衝液中への移動のために濃縮したり、又は溶液から巨大分子を移動させるに当たり稀釈溶液から溶離させること(透析)をも意味するものとして理解される。

本発明を説明する上で、より明確にするために、「電気溶離」という語はこれらの全ての面を含めて定義され、用いられる。本発明における電気的に荷電された巨大分子は、1000以上の分子量をもつ巨大分子、特にDNA、RNA又は蛋白質のような生物学的な巨大分子である。

(従来技術)

特許請求の範囲第1項の前文で述べたようなタイプの方法は、ジャーナル・アナリティカル・バ

当該技術分野の状態に照らすと、本発明の目的は、電気的に荷電された任意の材料から得られる巨大分子がより少ない損失とより低い操業費用をもってより早く電気溶離されるような方法とその実施するための装置を提供することである。

(課題を解決するための手段)

本発明は、特許請求の範囲第1項に記載された特徴部分をもつ方法を採用することにより、上記した目的を達成する。

換言すると、本発明の中心的概念は、外的な電場の作用下で溶離され移動された巨大分子を、吸着トラップ中に集める代りに、2つの高分子膜の間に形成されかつ蒸留水又は緩衝溶液で充填されたトラップ中に集めることからなる。このことは、溶離された巨大分子が電場の存在下では巨大分子さえも透過するような内側のトラップ膜にまず送られ、次いで電場下でさえも巨大分子を透過しない高分子膜のような外側のトラップ膜に送られた時に達成される。電場が切られた後は、内側のトラップ膜もまた以下なる物質の移動に対し

ても実質的に非透過性、すなわち詳しくは耐水性になり、そのため、そのトラップ中に濃縮された巨大分子は、例えばピペットで吸い取ることにより、そのトラップ中に囲まれた液体媒体と一緒にトラップから取り出される。この電気的に荷電された巨大分子の電気溶離工程は、少なくとも90%の収率で行われる。1つの電気泳動ゲル留分を溶離するためには、5分間以上の時間を必要としない。その上、従来方法では必要であつて一時的な吸着ゲルの費用が不必要となる。

本発明の方法では、トラップ中に移動された巨大分子が外側のトラップ膜上に蓄積された場合に問題が生じる。その結果、巨大分子はそのトラップ中に囲まれた液体媒体と一緒に定量的にすばやく取り出され得ない。そしてこの電場下でさえも巨大分子を透過しない外側のトラップ膜上における電気的に荷電された巨大分子の蓄積、付着及び/又は吸着は、次のようにして除去される。すなわち、実際の電気溶離が終了し、全ての巨大分子がトラップ中に移動させられたのち、外的な電場

の極性が短時間の間逆転させられ、その結果外側のトラップ膜上に蓄積した電気的に荷電された巨大分子はその膜から解き離され、トラップ媒体中に移動し戻る。逆転された極性の電場は、好ましくは10~15秒間適用される。また同じ目的は、制御された方法では負荷電の粒子又は正荷電の粒子のいずれかを吸着しないような膜を用いることにより達成される。この目的のためには、如何なる正荷電の粒子をも吸着しないような外側のトラップ膜が外的な電場の負電極の前で使用される。また反対に、如何なる負荷電の粒子をも吸着しないような外側のトラップ膜は、外的な電場の正電極の前で使用される。

勿論のことながら、上記した2つの方法を一緒に採用することも可能である。

溶離空間は、少なくとも1つの側でトラップにより隣接される。またその反対の側にトラップを設けることは好ましいが、原則としては、1つの近接した膜を設けることが必要である。本発明の方法と装置は、勿論のことながら、電場の極性が

正しい場合に電場中で溶離された巨大分子が実存するトラップ中に移動する範囲まで、近接した膜のない状態でさえもなお実施可能である。しかしながらこの方法で開放している溶離空間又は溶離チャンネルにおいては、トラップは、本発明の装置がそれ自体で知られた方法で操作されるような水平な電気泳動室中の比較的高度に濃縮された緩衝液又は電解液に常に直接結合される。溶離空間が電場のない状態で物質移動に対して実質的に非透過性であるような少なくとも1つの近接した膜により分離されている場合には、溶離空間中及びトラップ中で用いられる例えば緩衝溶液のような液体媒体は、電気泳動室中で用いられる緩衝溶液よりも実質的に一層稀釈されうる。特別な利点としては、トラップ及び溶離空間の充填には蒸留水でさえも用いうる。

本発明の態様によれば、トラップの体積は好ましくは溶離空間の体積の1/10~1/100である。巨大分子に対する注目すべき濃度効果は、この結果、トラップ中で同時に得られる。

前記した特性をもつ膜は種々な種類で商業的に容易に入手できる。好ましくは、使用される膜は水で湿潤されるか又は水中で膨潤されうる。そして詳しくは、膜はセルロース、セルロースエステル、ポリアミド、ポリイミド及びポリスルホンをベースとする。セルロースとセルロースエステル特に酢酸セルロースをベースとする膜は、ここでは特に好ましい。

内側のトラップ膜としては、0.05~0.2  $\mu\text{m}$  の範囲の孔径をもつ膜が選ばれる。一方、外側の膜としては、比較的に強い外的な電場の存在化でさえも1000以上の分子量をもつ分子を透過させないタイプのものが用いられる。内側の膜として好適な膜は再生セルロースをベースとした平均孔径 $\leq$  0.2  $\mu\text{m}$  のものであり、これは例えばRSBという名称で本出願人から入手可能である。外側のトラップ膜として好適な膜は約1000以上の分子量をもつ巨大分子に対して電場下で非透過性であり、これはRAB又はRCUという名称で本出願人から入

手可能である。しかしながら同等な膜は他の膜製造業者の間から幅広く選択しうるということは明らかである。その上、膜の使用者は上記した寸法上の制限についてまでは詳細に制約しないが、解決すべき特別な分離問題に従って膜の配置と組合せについては詳細に選定する。

その上、膜は、支持されていても支持されていなくてもよく、また強化されていても強化されていなくてもよく、また対称構造であっても対称構造でなくてもよい。その選択は、意図する目的により常に決定される。このような膜の選択は、当業者の日常的な慣例の範囲内のことである。しかしながら非対称の膜が用いられた場合には、本発明の1つの態様によれば、この非対称な膜の密な又は活性な表面が好ましくはトラップの内部に面するようにするという事に注意すべきである。

#### (発明の効果)

本発明の方法と装置は、とりわけ例えば DNA、RNA 及び蛋白質のような生物学的巨大分子を濃縮したり脱塩したりするために、電気泳動ゲルから

保するために、膜の最上端の真下にあたる高さに液位5をもつ。

電場が印加された後には、第1図では大きな円で表わされた負荷電の巨大分子は、内側のトラップ膜M2を通過して分離空間1から外側のトラップ膜M1に移動する。その巨大分子は電場の存在下でさえも外側の膜M1を透過し得ない。一方、分離空間1にある媒体からの緩衝液イオンは膜M1さえも容易に通過し、電気泳動室の緩衝液4に入る。負荷電の巨大分子は外側の膜M1の上に集まる。分離空間1中に存在する全ての負荷電の巨大分子が膜M2を通過してトラップ3中に移動させられた後に、電流の極性は10~15秒間逆転させられる。その結果、第1図では正電極が左側に、負電極が右側になる。このことより、外側の膜M1上に集まった負荷電の巨大分子は解き離され、トラップ3の内部に移動させられる。次いで巨大分子は、例えばトラップ3中に含まれる液体媒体をピペットで吸取ることにより、このトラップから定量的に回収されうる。電場が切られた場合には、膜M1、M2の

電気分離するのに用いられる。また本願の別の重要な分野は、それ自身の目的又は最終の目的として、適当に調節されたpH値で正荷電の巨大分子特に正荷電の蛋白質を濃縮すること、又は負荷電の巨大分子を精製しかつ、同時に濃縮すること、すなわち詳しくは正荷電の巨大分子と負荷電の巨大分子を分離することである。

本発明の工程と原理については、添付図面を参照しながら具体的な例を用いてより詳細に説明する。

#### (実施例)

第1図は、分離空間1、外的な電場の負電極に配置されたトラップ2、外的な電場の正電極に配置されたトラップ3、及び本発明の装置がその中で操作され、本発明の方法が実施される電気泳動室の電解液又は緩衝液4を示す。

第1図では、トラップ2、3の両方は質的に同じ膜、すなわち各々の場合に内側の膜M2と外側の膜M1とにより隣り合っている。電気分離が行われる媒体は、電流が通過する最大限可能な面積を確

両方は如何なる物質の移動に対しても実質的に非透過性、とりわけ耐水性になる。その結果、それらの膜は、分離空間1と電気泳動室の両方から、例えばピペットで吸取ることにより徐々に空になりつつあるトラップ3への新たな水の流れを特に防止する。

第2図は、膜の配置を変更した場合を示し、第1図と同じ符号を用いる。第2図で示される装置の場合には、2つの外側のトラップ膜M1とM3は、第1図の場合とは異なり、同じではない。むしろ第2図の具体例では、膜M1は如何なる正荷電の粒子をも吸着しないように調節される。また一方、外的な電場の正電極に面した外側のトラップ膜M3は如何なる負荷電の粒子をも少なくとも実質的に吸着しないように調節される。そして電極を交互に変えながら非常に短時間の間、電圧を急増させることにより、外側の膜M3の表面に保持された全ての電氣的に荷電した巨大分子はトラップ3の液体媒体中に移動させられる。また他方、第2図に示された装置は、第1図の場合に説明した方法と

同じようにして操作される。

内側の膜M2は耐水性である必要があり、そのためバクテリアに対して非透過性であるということは、特別な利点である。この方法では、バクテリアを完全に含有しない巨大分子濃縮液がトラップ2, 3で得られる。このバクテリアを含有しない溶離は、従来方法では不可能であり、多くの場合、バクテリアの攻撃により巨大分子特に生物学的材料から得られる巨大分子は驚く程の損失を受けた。

#### 4. 図面の簡単な説明

第1図は、本発明の方法を実施するための装置に関する第1の具体例を示したものである。

第2図は、同じく第2の具体例を示したものである。

1・・・溶離空間      2, 3・・・トラップ  
M1, M3・・・外側の膜    M2・・・内側の膜  
4・・・電気泳動室      5・・・液位

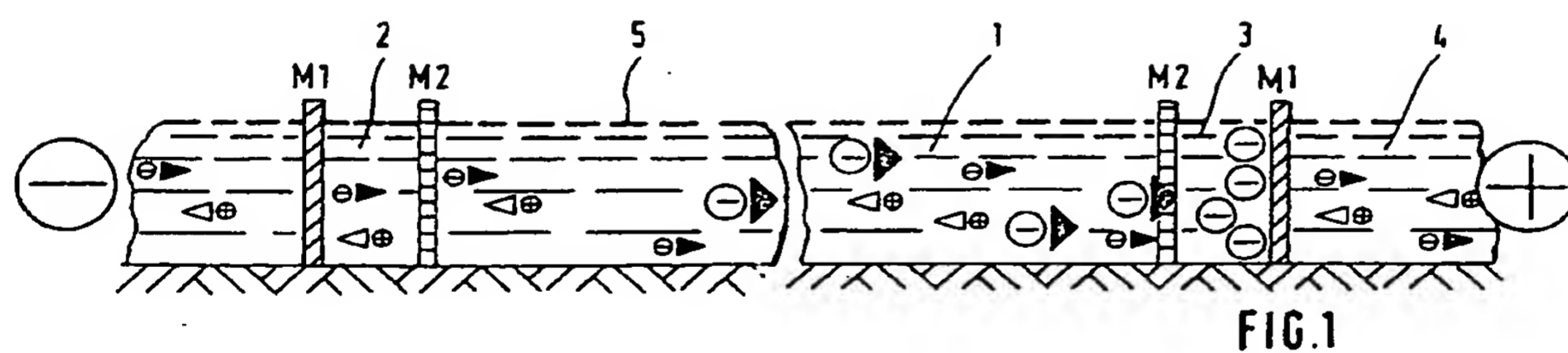


FIG. 1

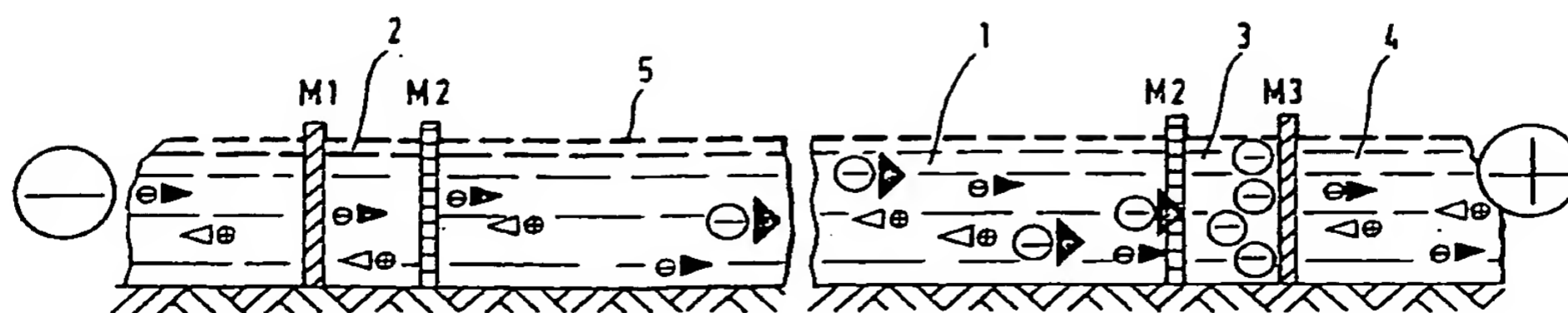


FIG. 2

第1頁の続き

⑦発 明 者	アンドレアス クラド	ドイツ連邦共和国、デー7800	フライブルグ、ヘルヘンシ ユトラーセ 3
⑧発 明 者	マンフレッド バアイ スバイラー	ドイツ連邦共和国、デー3350	クライエンセン 1、ガー ルレブセン 5